

## · 实验室研究 ·

80 株淋球菌分离株青霉素耐药性与 *penA* 及 *ponA* 基因的关系

张铁军 周晓明 张涛 姜庆五

**【摘要】** 目的 探讨淋球菌青霉素耐药性与青霉素结合蛋白 1 基因和 2 基因(*ponA*、*penA*)突变的关系。方法 采用琼脂稀释法对淋球菌临床分离株进行青霉素敏感性测定,分别运用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)和 PCR-限制性片段长度多态性(RFLP)对淋球菌 *penA* 及 *ponA* 基因进行分析。结果 在检测出的 80 株淋球菌临床分离株中,所有菌株的 *penA* 基因均发生了(Asp-345A)的插入突变,而菌株表现出对青霉素不同程度的耐药性;通过 RFLP 分析检测出有近 93.7% 的菌株发生了 *ponA* 基因第 421 位氨基酸由亮氨酸变成脯氨酸(Leu421→Pro)的突变。同时研究还表明所有的 PPNG 菌株也可同时发生 *penA* 基因的突变,除 2 例 *ponA* 基因未突变外,94.4% (34/36) 的 PPNG 可发生 *ponA* 基因的突变。结论 在淋球菌流行株中染色体介导和质粒介导两种方式协同作用造成了淋球菌对抗生素的高度耐药性。

**【关键词】** 淋球菌;青霉素;单链构象多态性;限制性片段长度多态性

Study on the correlation between gene *ponA*/*penA* and the penicillin-resistance of *Neisseria gonorrhoeae* ZHANG Tie-jun, ZHOU Xiao-ming, ZHANG Tao, JIANG Qing-wu. Key Laboratory of Public Health Safety, Ministry of Education; Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: JIANG Qing-wu, Email: jiangqw@fudan.edu.cn; ZHOU Xiao-ming, Email: xzmzhou@shmu.edu.cn

**【Abstract】** Objective TO investigate the relationship between *penA*/*ponA* and penicillin resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. Methods Agar dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the strains. Polymerase chain reaction-single stand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and PCR- restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to detect the mutations in *ponA* and *penA* genes, which encoding the penicillin binding protein-1 and -2 (PBP1 and PBP2), respectively. Results All the 80 *N. gonorrhoeae* isolates had a D345 insertion detected in *penA* while 93.7% of *N. gonorrhoeae* isolates having a point mutation Leu421→Pro in *ponA*. Most of the penicillinase-producing *N. gonorrhoeae* (PPNG) strains possessed the mutations in *ponA* and *penA*. Conclusion Our data suggested that the plasmid and chromosome mediated penicillin-resistance conjugately increased the level of resistance.

**【Key words】** *Neisseria gonorrhoeae*; Penicillin; Single stand conformation polymorphism; Restriction fragment length polymorphism

青霉素是临床治疗淋病的经典药物,但是随着抗生素在临床的广泛应用,过去的几十年里,淋球菌已形成了多种抗生素高水平的耐药性,青霉素就是其中之一。淋球菌对青霉素产生耐药机制常与青霉素结合蛋白(PBPs)有关,其中最主要的是 PBP1 和 PBP2,它们分别是由基因 *ponA*、*penA* 编码的,当此基因突变时,可降低它们与β-内酰胺类抗生素结合力,造成淋球菌耐药<sup>[1-4]</sup>。为了解上海地区 *penA* 及

*ponA* 基因的突变与淋球菌对青霉素耐药性的关系,我们进行了相关研究。

## 材料与方 法

## 1. 材料:

(1)淋球菌菌株:淋球菌样本菌株均为 2006 年 3 月至 2006 年 12 月间从上海市某区的 3 所性病专科门诊收集,淋球菌标准菌株 WHO-A、WHO-D 由中国药品生物制品鉴定所提供。

(2)相关试剂与仪器:①PCR 扩增引物、dNTP、Taq DNA 聚合酶、MgCl<sub>2</sub>、10× PCR buffer (Sangon

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院流行病学教研室 公共卫生安全教育部重点实验室

通讯作者:姜庆五, Email: jiangqw@fudan.edu.cn; 周晓明, Email: xzmzhou@shmu.edu.cn

公司产品)。②DNA Marker(上海申能博彩生物工程公司产品)。聚丙烯酰胺(29:1), 10%过硫酸胺(1 g过硫酸胺,溶于10 ml ddH<sub>2</sub>O中), TEMED(N, N, N, N', N'-四甲基乙二胺), 4℃保存(上海生工生物科技有限公司产品)。银染相关试剂购自上海申能博彩生物工程公司。PCR扩增仪为德国Biometra产品、BIO-RAD电泳仪。

(3)病例资料:共收集前来门诊就诊的病例88例,成功分离奈瑟淋球菌80例,已婚者占66.3%,未婚者占33.7%。调查对象平均年龄为33.98岁,其中21~30岁组36例,占45.0%、31~40岁组25例,占31.3%、41~50岁组14例,占17.5%,此三个年龄组的病例数占全部门诊调查对象的93.8%。本地户籍者占68.8%,外地户籍者占31.2%。职业分布中,以工人、干部、民工三者最多,分别占全部病例的42.5%、11.3%、11.3%。文化程度分布,大学及以上学历者占40.0%,高中及中专文化占36.2%,初中文化占20.0%,小学文化占3.8%。

## 2. 方法:

(1)淋球菌菌株的分离与培养:男性病例标本来自尿道口内3~4 cm处,女性病例来自宫颈口内1~1.5 cm处,标本立即接种于改良的T-M培养基上培养,5% CO<sub>2</sub>, 37℃培养24~48 h,菌株经染色、菌落形态观察和氧化酶试验鉴定后,在淋球菌营养培养基中进一步纯培养后用于总DNA的提取。

(2)淋球菌对青霉素敏感性测定:采用WHO西太区淋球菌耐药监测规划推荐的琼脂稀释法,按照2002年美国疾病预防控制中心淋球菌耐药性实验室监测方案判断各菌株耐药性情况,即最小抑菌浓度(MIC)≥2.0 μg/ml为耐药, MIC在0.125~1.0 μg/ml为中度耐药, MIC≤0.06 μg/ml为敏感<sup>[5]</sup>。

(3)淋球菌基因组DNA提取:参考《精编分子生物学实验指南》<sup>[6]</sup>。

(4)聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)对 *penA* 基因突变的检测:*penA* 基因PCR扩增所使用的上游引物是:5'-CCG TAA CCG ATA TGA TCG AAC-3', 下游引物是:5'-TGC ATA ATG CCG CGC ACA TCC-3'。反应体系为25 μl,依次加入 ddH<sub>2</sub>O、上下游引物(5 μmol/L)、10×PCR buffer(500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl)、MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)、dNTPs各2 mmol/L、Taq酶1 U、模板DNA 2 μl。在PCR仪中按以下程序扩增:94℃ 3 min预变性;94℃ 30 s、59℃ 30 s、72℃ 45 s, 40个

循环;72℃ 5 min;4℃保存。SSCP分析:将PCR扩增产物与变性上样液(95%甲酰胺、0.03%二甲苯青、0.05%溴酚蓝、20 mmol EDTA)按1:5的比例加入5 μl到微量离心管中,混匀。样品上胶前应98℃变性10 min,立即放入冰浴骤冷2~3 min。取约2 μl变性样品,以微量加样器上样,电泳、银染显影。

(5)PCR限制性片段长度多态性(RFLP)对 *ponA* 基因突变的检测:① *ponA* 基因扩增引物 *ponA* F:5'-GAA AAT GGG GGA GGA CCG TA-3', *ponA* R:5'-CTT AGA TAA TGC CGC CGA AT-3'。PCR扩增反应体系为25 μl,依次加入 ddH<sub>2</sub>O、上下游引物(5 μmol/L)、10×PCR buffer(500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl)、MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)、dNTPs各2 mmol/L、Taq酶1 U、模板DNA 2 μl。在PCR仪中按以下程序扩增:94℃ 5 min预变性;94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 1 min, 40个循环;72℃ 5 min;4℃保存。PCR产物在1%琼脂糖、10 V/cm凝胶的电压下进行电泳,约50~60 min,当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离DNA片段的距离时,关闭电源,于紫外灯下观察成像。② RFLP酶切回收PCR产物:在0.5 ml离心管中,依次加入适量的 ddH<sub>2</sub>O 7.5 μl,酶切反应缓冲液2 μl,BSA 2 μl、PCR产物8 μl和适量的限制性内切酶 *Pst* I(上海晶美生物技术有限公司),混匀后,将离心管置于37℃水浴消化2~3 h,电泳观察结果。

## 结 果

1. 淋球菌分离株耐药性测定:青霉素MIC范围在0.025~16 μg/ml,为4 μg/ml,其中耐药株(MIC≥2.0 μg/ml)占87.5%(70/80),中介菌株(0.125 μg/ml < MIC ≤ 1.0 μg/ml)占12.5%(10/80),所有检测的临床分离菌株中无青霉素敏感株(MIC < 0.06 μg/ml);产青霉素酶的菌株(PPNG)36株,占45.0%(36/80)。

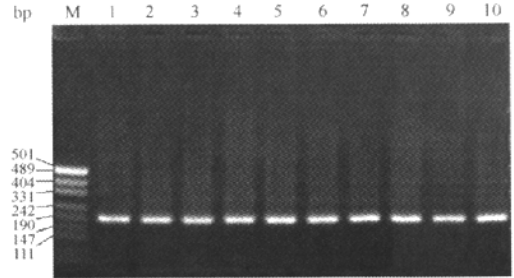
2. PCR扩增 *penA* 基因及序列分析:80株淋球菌临床分离株和标准菌株ATCC19424均能扩增出 *penA* 基因目的片段,PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后均呈现一条清晰的特异性带,大小与DNA标记比较,位置相符(图1)。

根据GenBank中的淋球菌敏感株(X54021 GI44988)与耐药株(X59632 GI509154)的序列,从网上BLAST程序结果可知,此2菌株在345位氨基酸之间相差一个Asp(天冬氨酸),即敏感株在 *penA*

基因上插入了 GAC 三个碱基(图 2),本研究 *penA* 扩增的区域正包括此插入位点。对 *penA* 基因 PCR 扩增产物进行了测序分析,由于所检测菌株未检测到青霉素敏感株,选择了 WHO-A、中介株、耐药株分别进行了测序,结果显示,WHO-A 已知对青霉素敏感,其未发生突变,而对青霉素中介及耐药的菌株均检测出发生了 *penA* 基因第 345 位点氨基酸密码子的突变(图 3)。

3. *penA* 基因的 SSCP 分析结果:以 WHO-A 为阴性对照,以耐药株为阳性对照,对 80 株临床分离淋球菌样本 *penA* 基因的目的区域进行 PCR 扩增,扩增产物经过 SSCP 银染分析观察其产生的不同带型。为了便于分析,用 A 表示 WHO-A 的构象带型, B 表示突变株的构象带型(图 4)。结果显示,所检

测的 80 株菌带型均为 B 型,根据阳性株测序结果可知,所检测的淋球菌临床分离样本编码菌株 PBP2 的基因 *penA* 均发生了(Asp-345A)插入突变,菌株同时表现出对青霉素不同程度的耐受性。



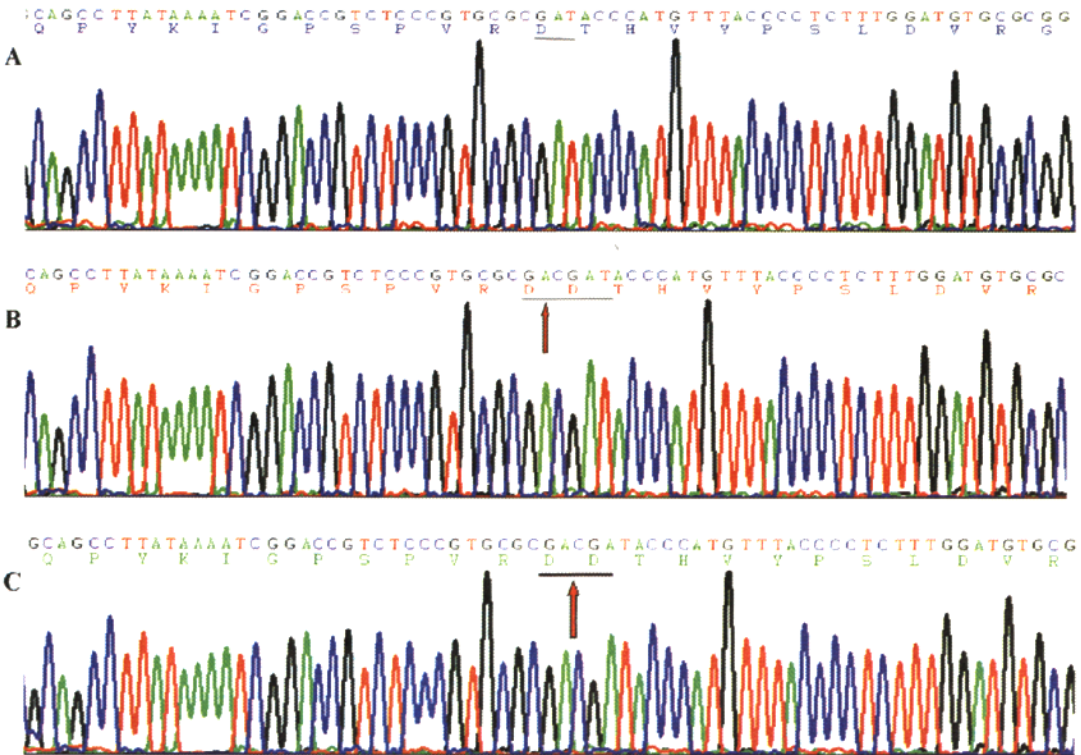
注: M: PUC19DNA/MIS (Hpa II) Marker; 1: WHO-A 菌株; 2: WHO-D 菌株; 3~10: 不同的淋球菌样本

图1 淋球菌 *penA* 基因扩增电泳图

Score = 77.6 bits (40), Expect = 2e-12  
Identities = 51/54 (94%), Gaps = 3/54 (5%)  
Strand=Plus/Plus

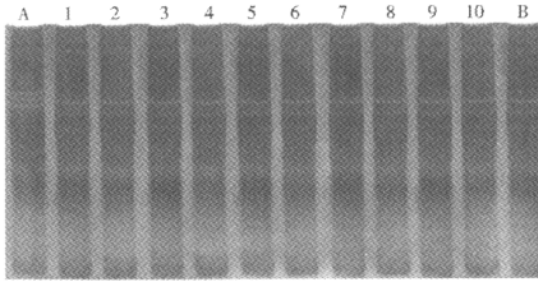
|                       |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CDS:penicillin-bindin | 1    | Y   | K | I | G | P | S | P | V | R | D | T | H | V | Y | P | S | L |   |
| Query                 | 1    | TATAAAATCGGACCGTCTCCCGTGGCGGATACCCCATGTTTACCCCTCTTTG E    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Sbjct                 | 1033 | TATAAAATCGGACCGTCTCCCGTGGCGGACGATACCCCATGTTTACCCCTCTTTG 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| CDS:penicillin-bindin | 337  | Y   | K | I | G | P | S | P | V | R | D | D | T | H | V | Y | P | S | L |

图2 淋球菌敏感株与耐药株 *penA* 基因部分序列 BLAST 结果



注:A:WHO-A 无突变株; B:中介菌株; C:耐药菌株

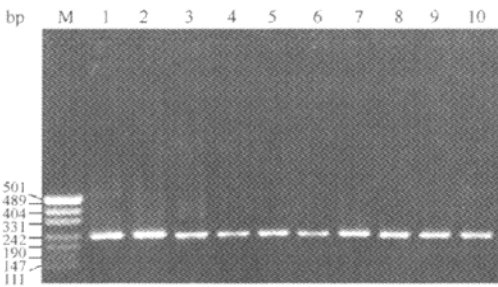
图3 淋球菌 *penA* 基因测序结果图(图中箭头为突变发生部位)



注:A:无突变株 WHO-A 的带型; B:突变株带型; 1~10:淋球菌样本株带型

图4 淋球菌 *penA*<sub>180</sub> 片段 SSCP 电泳图

4. PCR 扩增淋球菌 *ponA* 基因:对 80 株淋球菌基因组 DNA 用所合成的一对特异引物进行 PCR 扩增,所有的淋球菌均能有效扩增出目的片段,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,电泳图谱显示所有样本均呈现一条清晰的特异性条带,无非特异性产物条带,对照 PUC19DNA/MISP(Hpa II)Marker 可知道片段大小位置正确,扩增片段约为 250 bp (图 5)。

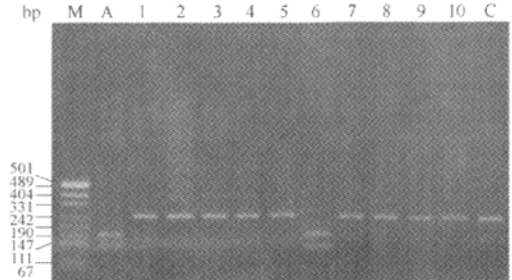


注:M:PUC19DNA/MISP(Hpa II)Marker; 1~10:不同淋球菌样本株

图5 淋球菌 *ponA* 基因扩增电泳图

5. RFLP 对 *ponA* 基因突变分析:根据 GenBank 中的淋球菌 *ponA* 基因序列(U72786 GI1914827)的序列,可知本次扩增区域包含了 *ponA* 基因易发生突变的第 1261 个碱基,此处常常可发生一个 T→C 碱基突变,导致第 421 位氨基酸由亮氨酸变成脯氨酸(Leu421→Pro)。根据此突变用 primer premier 5.0 对扩增片段序列进行分析,寻找酶切位点, *ponA* 基因该扩增片段有一个 *Pst* I 酶切位点,当菌株 *ponA* 基因此位点未发生突变时,所扩增的片段可以被 *Pst* I 酶切成两个片段大小分别为 94 bp 和 156 bp,当此处有突变发生时,则不能被 *Pst* I 酶切。本次以敏感株 WHO-A 为阴性对照,以耐药株为阳性对照,电泳图谱见图 6,结果显示 80 株临床分离

株中有 93.7% (75/80) 发生了突变,有 5 株未发生突变,包括 2 株 PPNG 株,对青霉素 MIC 为 16 mg/L; 另有 3 株非 PPNG 株,对青霉素的 MIC 分别为 1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L。



注:M:PUC19DNA/MISP(Hpa II)Marker; A:WHO-A; C:阴性对照; 1~10:淋球菌样本

图6 淋球菌 *ponA* 基因 RFLP 电泳图谱

### 讨论

本实验采用 PCR-SSCP、PCR-RFLP 技术对淋球菌 *penA*、*ponA* 基因突变进行研究。PCR-SSCP 原理是根据单链 DNA 常常呈复杂的空间折叠构象,这种立体结构主要是其内部碱基之间的分子相互作用力来维持的,当有某一个碱基发生改变时,会影响其空间构象,再通过非变性的聚丙烯酰胺凝胶,可以非常敏锐地将构象有差异的分子分开,由于该方法对点突变的检测是通过凝胶条带的变化而不是通过信号的缺失体现,因此不存在假阳性的结果,但可能出现假阴性结果,后者是由于点突变引起的空间构象变化甚微,迁移率相差无几所致,尤其是点突变发生在扩增片段的两端时。如果有阳性和阴性对照,结果可以重复确定的突变带是可信的,如果没有阳性对照,应经测序来确定其是否为突变带。SSCP 电泳带型没有一个固定的模式,可以是三条四条甚至是更多条带,但只要有一条单链与野生型标准单链有明显的泳动变位,就能证明该序列存在突变。因为 SSCP 分析的敏感性取决于 DNA 片段的长短,当 DNA 片段长度较短时,DNA 的突变对其空间构象的影响更为明显,因此本实验扩增 *penA* 基因最常发生突变的 180 bp,如果有突变株,则会因为插入三个碱基(GAC)而成为 183 bp,然后利用 SSCP 检测扩增产物有无插入突变,结果显示检测淋球菌均为阳性,可认为检测的淋球菌均为突变型。而 RFLP 对淋球菌 *ponA* 基因的已知突变进行检测,是根据 *ponA* 基因的扩增产物经过酶切后会显示不

同的片段长度多态性来进行判断的,当未发生突变的菌株均可以被酶切成 157 bp、94 bp 两个片段,而突变株则不能被酶切,电泳结果只显示长度为 250 bp 的条带。

有研究资料表明 PBP2 对青霉素的亲和力改变是淋球菌染色体介导对青霉素耐药的一个最主要机制,当编码基因 *penA* 发生插入突变后,在 PBP2 转肽酶的结构域插入一个天冬氨酸,对降低 PBP2 与青霉素亲和力起着重要作用,使青霉素对细胞壁的酰化速度下降 4~5 倍,因此起到了增强细菌的耐药性的效果,这个突变常常被认为是淋球菌染色体介导对青霉素耐药的首要步骤,有学者发现在染色体介导耐药的淋球菌菌株和一些中介的淋球菌菌株中,100% 检测出有此位点的突变<sup>[7]</sup>,本次研究结果与国外基本一致,我们所检测的临床分离均为对青霉素耐药或者中介菌株,所有检测的菌株(包括 PPNG)均有青霉素结合蛋白编码基因 *penA* 上 Asp-345A 密码子的改变,降低了 PBP2 与青霉素的亲和力,造成对青霉素的耐药性,进一步证明了 *penA* 基因突变与青霉素敏感性降低存在密切关系。

国外有研究发现,在 *penA* 基因介导淋球菌对青霉素耐药的同时,高水平的青霉素耐药还与 PBP1 对青霉素亲和力下降有关,*ponA* 基因对于青霉素耐药也是一个重要的补充,淋球菌染色体介导的耐药株中 *ponA* 基因的编码序列中往往只在第 421 位密码子发生突变,使第 421 位氨基酸由亮氨酸变成脯氨酸(Asp421→Pro),这是目前为止在 *ponA* 基因上检测到的惟一一个点突变,这一改变使得突变菌株与野生型菌株相比 PBP1 与青霉素的亲和力下降 3~4 倍<sup>[3,8,9]</sup>。我们用 RFLP 对此位点进行了酶切鉴定,发现在本次分离的临床菌株中在此位点发生突变的比例也相对较高,而野生敏感株未发生该位点的突变。

综上所述,在上海地区淋球菌临床分离株中青霉素的耐药性十分严重,且无论是 PPNG 或者是非 PPNG 株,100% 可以发生 *penA* 基因的突变,而且绝大多数(近 93.7%)的菌株中也同时会伴有 *ponA* 基因的点突变,说明了在上海地区的淋球菌中同时

存在质粒介导和染色体介导的青霉素耐药性,耐药菌株发生了染色体耐药基因突变的同时,也会携带耐药质粒,此二者共同造成了淋球菌对青霉素耐药性的流行,今后在上海地区淋病的预防和控制用药应当充分考虑淋球菌流行株的这一特点。

#### 参 考 文 献

- [1] Gordon E, Mouz N, Duee E, et al. The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol*, 2000, 299(2):477-485.
- [2] Fontana R, Cornaglia G, Grossato A, et al. The penicillin-binding proteins: Targets for beta-lactam antibiotics action and determinants of resistance. *Igiene Moderna*, 1999, 112 Suppl 1: S183-196.
- [3] Kopp PA, Hu M, Olesky M, et al. Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(3):769-777.
- [4] Malakhova MV, Vereshchagin VA, Il'ina EN, et al. Analysis of genetic markers of *N. gonorrhoeae* resistance to beta-lactam antibiotics. *Bull Exp Biol Med*, 2006, 141(5):610-615.
- [5] National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth international supplement. Wayne, PA. M100-S12. NCCLS, 2002, 22 (1): 53-55.
- [6] 奥斯伯,布伦特,金斯,等著//顾子颖,王海林,金冬雁,译.精编分子生物学实验指南.北京:科学出版社,1998:39-40.
- [7] Tirodimos I, Tzelepi E, Katsougiannopoulos VC. Penicillin-binding protein 2 genes of chromosomally-mediated penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* from Greece: screening for codon Asp-345A. *J Antimicrob Chemother*, 1993, 32(5):677-684.
- [8] Ameyama S, Onodera S, Takahata M, et al. Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 gene (*penA*) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(12):3744-3749.
- [9] Shigemura K, Shirakawa T, Massi N, et al. Presence of a mutation in *ponA1* of *Neisseria gonorrhoeae* in numerous clinical samples resistant to various beta-lactams and other, structurally unrelated, antimicrobials. *J Infect Chemother*, 2005, 11(5):226-230.

(收稿日期:2007-03-15)

(本文编辑:尹廉)